

## 不同培养条件对悬浮培养茶叶细胞生长及 茶氨酸合成的影响<sup>\*</sup>

华萍<sup>1</sup>, 吕虎<sup>2</sup>, 余继红<sup>2</sup>, 冷和平<sup>3</sup>, 蒋献猷<sup>3</sup>, 华东<sup>2</sup>

(1 南昌大学医学院, 江西 南昌 330006; 2 江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330027;

3 江西绿色制药有限公司, 江西 南昌 330002)

**摘要:** 婺源绿茶嫩叶用 MS 培养基 (加 IBA 2 mg/L, 6-BA 4 mg/L) 进行茶叶愈伤组织悬浮培养, 研究了不同培养条件对茶叶细胞悬浮培养过程中细胞生长与茶氨酸合成的影响。结果显示,  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  1.0/60.0 mmol/L、 $\text{K}^+$  100.0 mmol/L、 $\text{Mg}^{2+}$  3.0 mmol/L、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  3.0 mmol/L、蔗糖 30.0 g/L、水解酪蛋白 2.0 g/L 条件下, 茶叶细胞生长量和茶氨酸积累量均达到最高值; 提高培养基中蔗糖和水解酪蛋白浓度可使细胞对数生长期和稳定期得到延长, 从而有利于茶氨酸积累;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  浓度主要影响细胞生长速率和茶氨酸积累速率的同步性, 低  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  浓度环境中茶氨酸积累速率峰值滞后于细胞增长速率峰值, 高  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  浓度环境中早于细胞生长速率峰值出现时间;  $\text{K}^+$  和  $\text{Mg}^{2+}$  对细胞生长的影响不明显, 但影响细胞茶氨酸合成酶活性, 维持适量的  $\text{K}^+$  和  $\text{Mg}^{2+}$  有利于茶氨酸积累。添加盐酸乙胺可大幅度提高茶氨酸积累量, 并且先加入一定量盐酸乙胺再每天进行少量补充, 茶氨酸合成量比一次性加入的效果要好。茶叶细胞生长和茶氨酸积累高峰期在整个培养过程的第 19~22 天出现, 从生产效率考虑, 培养周期以 19~22 天为宜。

**关键词:** 茶氨酸; 茶叶; 细胞培养; 生物合成

中图分类号: TS 202.3, Q 946

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2006)02-215-04

## Effects of Different Culture Conditions on Cell Growth and Theanine Biosynthesis in Suspension Cells of *Camellia sinensis* (Theaceae)

HUA Ping<sup>1</sup>, LÜ Hu<sup>2</sup>, YU Ji-Hong<sup>2</sup>, LENG He-Ping<sup>3</sup>, JIANG Xian-You<sup>3</sup>, HUA Dong<sup>2</sup>

(1 Medical College, Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2 College of Life Science, Jiangxi Normal University,

Nanchang 330027, China; 3 Jiangxi Green Pharmacy Company Limited, Nanchang 330002, China)

**Abstract:** The suspension culture of callus obtained from tender leave of *Camellia sinensis* was conducted with MS medium plus IBA 2 mg/L and 6-BA 4 mg/L in a fermenter. The effects of different factors on the growth of tea cells and the amount of synthesized theanine were analyzed. The results showed that both the tea cell growth and theanine accumulation reached their peak period from 19 to 22 days after culture. Both growth of the cells and the amount of theanine reached optimal values when the medium contained  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  1.0/60.0 mmol/L,  $\text{K}^+$  100.0 mmol/L,  $\text{Mg}^{2+}$  3.0 mmol/L,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  3.0 mmol/L, sucrose 30.0 g/L and protein 2.0 g/L. Both the logarithmic and stationary phases were enhanced when the amount of sucrose and protein were raised in the medium. Alteration of  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  concentration in the medium had an effect on the simultaneity of the cell growth and theanine accumulation. The activity of theanine synthetase (L-glutamate: ethylamine ligase) can be affected by  $\text{K}^+$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . Accumulation of theanine could be greatly raised when ethylamine was supplemented in the medium. The efficiency of ethylamine on the accumulation of theanine is related to the addition method, i.e. sequential supplement of ethylamine into the medium was better than single addition of that.

**Key words:** Theanine; *Camellia sinensis*; Suspension culture; Biosynthesis

\* 收稿日期: 2005-07-02, 2005-10-08 接受发表

作者简介: 华萍 (1961-) 女, 副教授, 主要从事生物医药研究。

茶氨酸 (N-乙基-L-谷氨酰胺, N-ethyl-L-glutamine) 为茶叶的特征性氨基酸, 也是茶叶的呈味物质之一; 茶氨酸可抑制其它食品中的苦味和辣味物质、改善食品风味, 并且具有多方面的药理作用, 在食品和医药行业中具有很高的应用前景 (高小红等, 2004)。固体培养基和液体培养基摇瓶振荡培养研究表明, 培养基中添加初级胺类前体物质、适宜的植物激素组合, 可大幅度提高茶树愈伤组织茶氨酸合成量 (高小红等, 2004; 杜荣茂和詹太华, 2003; 汤焱, 2002; Matsuura 等, 1992; Furuya 等, 1990); 培养基中的无机元素含量、碳源、氮源等因素都对茶树细胞生长与茶氨酸合成具有不同影响 (高小红等, 2004; 成浩和高秀英, 2004)。本文采用正交试验设计, 以婺源绿茶嫩叶为材料用 MS 培养基进行茶叶愈伤组织悬浮培养, 研究了不同培养条件对茶叶细胞悬浮培养过程中细胞生长与茶氨酸合成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

采自江西婺源县鄣公山地区的婺源绿茶嫩叶, 经 10% 次氯酸钙溶液 15 min 表面消毒后在固体培养基上诱导成为愈伤组织, 取其中较为疏松的愈伤组织在含 0.5% 纤维素酶的 MS 液体培养基中消化 30 min 后接种到

MS 液体培养基中置摇床振荡培养 (转速  $100 \pm 10$  r/min, 振幅 2~3 cm), 每 7 天继代一次, 接种量为 10 g 鲜细胞/100 ml。连续继代 7 次后将三角瓶静置 30 min, 取上层细胞液建立悬浮培养细胞系。

1.2 培养方法

搅拌式发酵罐 (20 L, Bioengineering NLF22, 桨叶板式搅拌器), 转速 90 r/min, 通气量 1.0~1.2 vvm; 接种量 5 g 鲜细胞/100 ml 培养基; 于培养第 5 天加入 25 mmol/L 盐酸乙胺; 培养温度  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

1.3 基础培养基

MS 培养基, 加 IBA 2 mg/L, 6-BA 4 mg/L。

1.4 培养基成分对细胞生长与茶氨酸合成量的影响

采用正交实验设计, 考察大规模培养过程中培养基中氮源、碳源、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 、 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  等因素对细胞增长和茶氨酸合成的影响。

1.5 细胞总量测定

取定量悬浮细胞培养液在 2 000 r/min 下离心 10 min, 沉淀物于  $70^\circ\text{C}$  恒温箱中干燥至恒重, 精密称量干燥细胞总重量。

1.6 茶氨酸含量测定

定量精密称取干燥至恒重的细胞, 粉碎后用 80% 乙醇溶液 ( $75^\circ\text{C} \sim 80^\circ\text{C}$ ) 浸提 2 h, 浸提液经过滤后作为上样液。采用氨基酸分析仪 (日历 835-50 型); 分析条件为: 分离柱  $\Phi 4 \times 150$  mm, 2619 F 树脂 (日历公司); 滤氮柱  $\Phi 4 \times 150$  mm, 2650 树脂 (日历公司); 缓冲液 I pH 1.6, 缓冲液泵流速 0.45 ml/min, 压力 90 kg/cm<sup>2</sup>; 茚三酮流速 0.30 ml/min, 压力 10 kg/cm<sup>2</sup>; 进样量 500  $\mu\text{l}$ 。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水平 levels	因素 Factors					
	$\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (mmol/L)	$\text{K}^+$ (mmol/L)	$\text{Mg}^{2+}$ (mmol/L)	$\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (mmol/L)	蔗糖 (g/L)	水解酪蛋白 (g/L)
	A	B	C	D	E	F
1	10.0/60.0	80.0	1.0	2.0	30.0	0.0
2	4.0/60.0	100.0	2.0	3.0	40.0	1.0
3	1.0/60.0	120.0	3.0	4.0	50.0	2.0

2 结果与讨论

2.1 茶叶细胞生长周期与茶氨酸生物合成曲线

实验结果显示, 在一个培养周期中, 悬浮培养的茶叶细胞呈现几个不同的生长阶段; 在培养的第 10 天茶叶细胞生长开始进入加速期 (acceleration phase), 细胞数量逐渐增加; 第 13 天开始进入对数生长期 (logarithmic phase), 细胞总量迅速增加; 从第 19 天前细胞增长速度减慢而转入稳定生长期 (stationary phase); 第 22 天后细胞数量逐渐减少转入衰减期 (decline phase)。茶氨

酸的合成速度在细胞对数生长中后期开始迅速增加, 积累速率略滞后于细胞增长速率, 培养至第 19~22 天左右积累量达到峰值, 以后逐渐下降; 并且茶氨酸积累量与细胞生长量密切相关 (表 2)。本文研究与 Matsuura (1992) 和 Furuya (1990) 的研究结果基本一致。从生产效率考虑, 细胞培养周期以 22 天为宜。

2.2 培养基组成对细胞生长与茶氨酸合成量的影响

表 2 结果显示,  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  等元素不同含量以及蔗糖、水解酪蛋白不

同浓度的组合对茶叶细胞增长周期、生长量和茶氨酸积累量均产生影响。从表 2 结果直观分析可见, 以收获的茶叶细胞量和茶氨酸积累总量为考察指标, 6 种主要因素的最佳组合为  $A_3B_2C_3D_2E_1F_3$ , 茶叶细胞生长量 (16.33 g/100 ml) 和茶氨酸积累量 (205.57 mg/gDW) 均达到

最高值; 实验结果与其它文献 (张莹等, 2003; Matsuura 等, 1992; Furuya 等, 1990) 报道的在摇瓶培养和固体中获得最佳组合各主要因素含量有一定的差异。由此表明, 摇瓶培养获得的工艺参数不能直接用于放大培养; 进行工业放大时应综合考虑各种因素影响。

表 2  $L_{18}(3^7)$  正交实验设计及结果表  
Table 2 Orthogonal design and results

实验次数 times	A	B	C	D	E	F	10 <sup>h</sup> d	13 <sup>h</sup> d	16 <sup>h</sup> d	19 <sup>h</sup> d	22 <sup>h</sup> d	25 <sup>h</sup> d	28 <sup>h</sup> d
1	1	1	1	1	1	1	5.73 31.04	8.99 74.74	14.06 81.00	14.99 137.44	13.96 138.69	12.54 101.01	11.79 93.71
2	1	2	2	2	2	2	5.98 29.22	8.79 99.16	14.36 153.24	14.72 179.90	14.48 183.37	13.93 150.32	12.99 150.11
3	1	3	3	3	3	3	5.77 30.64	9.33 87.71	13.75 109.45	14.61 108.36	14.02 102.22	14.00 103.13	13.67 96.99
4	2	1	1	2	2	3	6.01 31.97	10.43 90.02	12.60 98.33	13.90 133.93	13.81 134.44	13.82 120.92	13.18 118.07
5	2	2	2	3	3	1	6.33 28.80	11.01 84.14	14.07 109.81	13.61 109.81	13.53 100.10	12.26 97.77	11.04 96.39
6	2	3	3	1	1	2	5.65 29.11	9.74 92.10	15.00 117.34	14.67 149.01	14.01 156.43	13.66 120.09	12.20 106.66
7	3	1	2	1	3	2	5.60 29.92	10.59 104.59	13.97 136.87	15.84 196.32	15.02 206.00	14.41 197.33	13.16 194.04
8	3	2	3	2	1	3	5.96 30.07	10.22 51.26	14.39 107.05	16.09 204.11	16.33 205.57	16.19 201.00	14.84 192.82
9	3	3	1	3	2	1	5.88 28.35	9.87 164.42	15.02 201.09	15.64 196.74	13.97 183.15	12.05 180.00	11.63 156.40
10	1	1	3	3	2	2	5.69 27.43	9.95 151.39	14.99 189.99	15.31 183.63	14.05 183.01	13.33 178.56	13.19 179.70
11	1	2	1	1	3	3	5.57 28.01	10.01 99.35	15.34 148.57	15.77 160.33	14.61 166.05	14.00 160.00	13.06 158.12
12	1	3	2	2	1	1	5.90 30.00	10.04 98.96	15.22 130.11	15.01 147.37	14.02 132.70	11.96 121.29	10.81 105.05
13	2	1	2	3	1	3	5.99 31.03	9.99 117.64	15.46 150.48	15.46 150.10	15.03 145.04	13.44 141.74	13.16 129.96
14	2	2	3	1	2	1	5.41 30.77	8.94 79.46	14.43 101.37	14.22 128.92	13.79 159.38	13.05 130.67	12.77 124.99
15	2	3	1	2	3	2	5.55 31.21	9.38 110.00	14.57 140.04	14.54 173.14	14.55 170.90	14.17 167.77	12.00 168.12
16	3	1	3	2	3	1	5.76 29.55	9.43 106.54	14.11 151.02	14.00 197.25	13.37 196.50	13.04 183.37	12.83 169.56
17	3	2	1	3	1	2	5.48 26.53	10.00 111.21	14.70 150.67	14.59 150.70	13.75 149.31	12.99 144.51	12.57 145.69
18	3	3	2	1	2	3	5.93 27.44	10.27 89.78	14.32 160.09	15.01 197.28	15.00 187.01	14.20 174.43	13.01 161.55

(1) 表中 A、B、C、D、E、F 分别表示培养基中  $NH_4^+/NO_3^-$ 、 $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $H_2PO_4^-$ 、蔗糖和水解酪蛋白 6 种考察因素; 1、2、3 代表各因素的 3 个不同浓度水平; (2) 10<sup>h</sup>d~28<sup>h</sup>d 列数据分别为培养不同天数取样检测结果; 做 3 个平衡, 结果取均值; (3) 检测结果中第一行数据为茶叶细胞总量 (g/100 ml), 第二行数据为茶氨酸积累量 (mg/gDW)。  
(1) In the table, A, B, C, D, E and F represent the medium mixed with  $NH_4^+/NO_3^-$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $H_2PO_4^-$ , sucrose and protein; the different levels of each factor are indicated with 1, 2 and 3, respectively; (2) The data in right lines were tested separately on 10<sup>h</sup>d~28<sup>h</sup>d during the culture period. Each item was measured three times and its figures is the average of the measured values; (3) In the table, the data in the first row and in the second row represent the figures of cell weight (g/100 ml) and theanine accumulation (mg/gDW), respectively.

H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 浓度环境中茶氨酸积累速率峰值滞后于细胞增长速率峰值, 而高 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 浓度环境中茶氨酸积累速率峰值出现时间前移; K<sup>+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 对细胞生长的影响不明显, 但影响茶氨酸合成酶活性, 维持适量的 K<sup>+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 有利于茶氨酸积累; 提高培养基中蔗糖和水解酪蛋白浓度可使细胞对数生长期和稳定期得到延长, 从而有利于茶氨酸积累。这些因素对茶氨酸合成的作用机制还有待进一步研究。

2.3 盐酸乙胺及其添加方式对茶叶细胞生长与茶氨酸积累量的影响

表3 盐酸乙胺加入方式与茶叶细胞生长/茶氨酸积累的关系

Table 3 Growth dynamics of tea cell and accumulation of theanine with different ZnNH<sub>2</sub>-HCl-adding modes

培养时间 (d) Cultured duration (d)	10 <sup>th</sup> d	13 <sup>th</sup> d	16 <sup>th</sup> d	19 <sup>th</sup> d	22 <sup>th</sup> d	25 <sup>th</sup> d	28 <sup>th</sup> d
细胞总量 (g/100 ml)	6.07	10.89	14.34	15.87	16.00	15.47	14.52
Cell quantity (g/100 ml)	5.96	10.22	14.39	16.09	16.33	16.19	14.84
	5.99	10.05	15.00	16.27	16.09	15.80	14.77
茶氨酸积累量 (mg/gDW)	32.13	46.66	45.02	44.04	43.15	34.10	29.76
Accumulation of theanine (mg/gDW)	30.07	51.26	107.05	204.11	205.57	201.00	160.28
	30.01	68.72	122.33	207.05	206.16	197.64	172.31

(1) 做3个平衡, 结果取均值; 第一行数据为不加盐酸乙胺; 第二行数据为培养第5天加入25 mmol/L 盐酸乙胺; 第三行数据为培养第5天加入20 mmol/L 盐酸乙胺, 并且每天补充1 mmol/L 盐酸乙胺。

(1) Each item was measured three times and its figure was the average of the measured values. The data in the first row are the ones without ZnNH<sub>2</sub>-HCl addition; the figures in the second row are the ones with ZnNH<sub>2</sub>-HCl added at 25 mmol/L on the fifth day culture; the figures in the third row are the ones with ZnNH<sub>2</sub>-HCl added at 20 mmol/L on the fifth day culture and then at 1 mmol/L each culture day.

资料报道, 当在培养基中添加25 mmol/L 的乙胺时, 茶叶愈伤组织的茶氨酸合成量处于最大值(张莹等, 2003; 汤熒, 2002)。本文研究通过对一次性添加和多次添加盐酸乙胺的比较研究结果显示, 先加入一定量盐酸乙胺再每天进行少量补充, 茶氨酸合成量比一次性加入的效果要好, 茶氨酸积累高峰时间在培养22 d 出现。培养基中盐酸乙胺浓度维持在20 mmol/L 以上时, 茶叶愈伤组织的茶氨酸合成量和细胞生长量即可保持良好状态; 大规模培养时以多次添加方式补充盐酸乙胺等前体物可使细胞中茶氨酸合成酶活性水平处于较高状态, 在细胞密度较高时更是如此; 可能是, 添加的前体物质能促进或诱导细胞中茶氨酸合成活性, 使细胞充分利用前体进行茶氨酸合成; 在培养基中保持一定量的盐酸乙胺等前体物有利于提高茶氨酸合成速率和积累量。

由表3 可见, 添加茶氨酸合成前体物质盐酸乙胺对茶叶细胞生长量影响较小, 培养前期细胞增长量基本一致, 培养后期添加盐酸乙胺的细胞增长量略有增加。但是, 添加盐酸乙胺后对茶氨酸合成量的影响非常明显; 在没有添加盐酸乙胺时, 培养细胞中的茶氨酸合成量很少并且几乎没有增加; 当添加了盐酸乙胺后, 细胞中的茶氨酸合成量从培养后第10 天后开始迅速增加, 于培养至19~22 天左右达到高峰, 之后逐渐下降。本文结果与前人的研究相似(成浩和高秀英, 2004; Matsuura 等, 1992; Furuya 等, 1990)。

Cheng H (成浩), Gao XY (高秀英), 2004. Dynamics of theanine biosynthesis in tea suspension [J]. *J Tea Sci* (茶叶科学), **24** (2): 115—118

Du RM (杜荣茂), Zhan TH (詹太华), 2003. Progress in studies of L-theanine [J]. *Fujian Tea* (福建茶叶), **2**: 9—11

Furuya Tsutomu, Orihara Yutaka, Tsuda Yumiko, 1990. Caffeine and theanine from cultured cells of *Camellia sinensis* [J]. *Phytochemistry*, **29** (8): 2539—2543

Gao XH (高小红), Yuan H (袁华), Yu ZY (喻宗沅), 2004. Research progress of L-theanine [J]. *Chem Biotech* (化学与生物工程), **1**: 7—9

Matsuura Takao, Kakuda Takami, Kinoshita Tatsuyaki, et al., 1992. Theanine formation by tea suspension cells [J]. *Biosci Biotech Biochem*, **56** (8): 1175—1181

Tang Y (汤熒), 2002. Biosynthesis, pharmacology and utilization in food of theanine [J]. *J Tea Business* (茶业通报), **24** (4): 19—21

Zhang Y (张莹), Shi ZP (施兆鹏), Shi L (施玲), 2003. Progress in studies of theanine [J]. *Natural Product Res Dev* (天然产物研究与开发), **15** (4): 369—72

【参 考 文 献】